

炎症性腸疾患におけるサイトカインの評価:

粘膜局所における発現と臨床像の対比

井上 滋夫

背景: Crohn 病 (CD) と潰瘍性大腸炎 (UC) ではサイトカインが炎症の発生や持続に関与している。そこで、UC と CD における粘膜局所のサイトカイン mRNA の発現を RT-PCR 法で検出し、臨床像との関係を検討した。

対象と方法: 1) UC 79例, CD 18例, 急性腸炎13例, 健常者16例を対象とし、大腸内視鏡検査下に採取した直腸粘膜から mRNA を抽出し RT-PCR 法で IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-15 の mRNA 発現の有無を判定した。各疾患群におけるサイトカイン陽性率を比較し、さらに UC では検査時および1年後の臨床的活動性、内視鏡所見、および組織学的炎症の程度と陽性率の関係を検討した。

2) CD 36例, 急性腸炎14例, 健常者16例を対象とし、同様の方法を用いて回腸粘膜におけるサイトカイン陽性率を比較検討した。

結果: 1) UC では健常者よりも IL-4, IL-10, および IL-13 の陽性率が高かった。また急性腸炎よりも IL-4 の陽性率が高く、CD よりも IL-13 の陽性率が高値を示し、いずれも有意差がみられた。臨床的活動性、内視鏡所見、組織学的炎症のいずれにおいても、活動期 UC では非活動期 UC よりも IL-4 と IL-13 の陽性率が有意に高かったが、サイトカイン発現の有無と1年後までの治癒率や再発率に有意な関係を指摘できなかった。

2) CD では健常者よりも IL-10 の陽性率が有意に高かったが、急性腸炎とは差はなかった。

結論: UC と CD ではサイトカインの発現が異なり、前者では Th 2 系サイトカインの中でも IL-4 と IL-13 が病態や重症度と密接に関与すると考えられた。一方、IL-10 は腸管の炎症で非特異的に発現する可能性が示唆された。

(平成11年9月16日受理)

Assessment of Cytokines in Inflammatory Bowel Disease: Comparison between Local mRNA Expression and Clinical Findings

Shigeo INOUE

Background: It has been described that various cytokines mediate mucosal inflammation in ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). The aim of this study was to characterize mRNA expression of various cytokines in the intestinal mucosa of CD and UC, and to correlate it with clinical features of the diseases.

Subjects and methods: 1) Total RNA was extracted from rectal biopsy specimens obtained from 79 patients with UC, 18 patients with CD, 13 inflammatory controls and 16 noninflammatory

controls. mRNA expression of IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13 and IL-15 was determined by means of reverse transcription (RT) - PCR. Positive rate of each cytokine was compared among the four groups of subjects. In UC patients, positive rate was compared among subgroups divided by disease activities and clinical course.

2) Cytokine expression in the ileal biopsy specimens was determined in 36 patients with CD, 14 inflammatory controls and 16 noninflammatory controls. The positive rate was compared among the three groups of subjects.

Results : 1) Positive rates of IL-4, IL-10 and IL-13 were higher in the specimens from UC patients than in those from noninflammatory controls. IL-4 was more frequently positive in UC than in inflammatory controls. In addition, positive rate of IL-13 was higher in the specimens from UC patients than in those from CD patients. While IL-4 and IL-13 were more frequently positive in active UC, positive rate of any cytokines was not different among the groups classified by the subsequent clinical course.

2) In ileal biopsy specimens, IL-10 was more frequently positive in CD than in the noninflammatory controls, but the value did not differ from that in the inflammatory controls.

Conclusions : There seems to be a difference in the mRNA expression of cytokines in the intestinal mucosa between CD and UC. IL-4 and IL-13 are pivotal in active UC, thereby suggesting that these cytokines play an important role in the pathogenesis of UC. Local expression of IL-10 is not specific to IBD, but it is rather overexpressed in nonspecifically inflamed mucosa. (Accepted on September 16, 1999) *Kawasaki Igakkaishi* 25(4) : 257-267, 1999

Key Words ① Inflammatory bowel disease ② Ulcerative colitis
③ Crohn's disease ④ Cytokine ⑤ Human

緒 言

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis ; 以下 UC) とクローン病 (Crohn's disease ; 以下 CD) は腸管の非特異的炎症を特徴とする疾患である。UC と CD は異なった臨床像や組織所見を呈する独立した疾患であるが、ともに若年者に好発する原因不明の慢性疾患であることから、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease ; 以下 IBD) と総称されている。IBD の成因として、環境因子、遺伝的素因、感染、あるいは食事抗原の関与が注目されてきた¹⁾が、ステロイド剤が奏効することや自己抗体陽性例の存在などから、免疫異常の関与も強く示唆されてきた。

近年、IBD においては腸管リンパ球の機能亢進による腸粘膜局所での過剰な免疫反応が炎症の持続、増悪、あるいは再発に関与する可能性

が指摘されている²⁾。なかでも、ヘルパー T 細胞 (Th 細胞) に関する研究が進み、UC ではインターロイキン (IL) -4, IL-10, IL-13などの局所サイトカインを産生する Th 2 細胞が優位であるのに対し、CD では IL-2, γ -interferon (IFN- γ) を産生する Th 1 細胞の機能亢進が報告されている^{3), 4)}。

以上のことから、IBD の炎症局所におけるサイトカインの研究が進んでいるが⁵⁾、臨床像との対比を詳細に検討した報告は比較的少ない。一方、近年新たに同定された IL-13 や IL-15 と炎症性腸疾患の関係については未だ明らかにはされていない。そこで、本研究では UC と CD における IL-13 と IL-15 を含めた局所サイトカインの発現を reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて同定し、疾患特異性の検討および臨床像との対比を試みた。なお、結果の一部は既に他誌に報告した⁶⁾

が、本研究では対象症例数を増やし、加えてCDについても検討することで、サイトカインからみたUCとCDの異同を考察した。

対 象 と 方 法

UCは直腸から口側腸管へ進展するのに対し、CDは回盲部に好発するのが臨床的特徴とされている。従って、本研究の実施にあたっては、まず最初に検討部位を直腸および回腸末端部の2カ所に設定した。1996年5月から1999年6月までの期間に川崎医科大学消化器内科Ⅱに通院あるいは入院し、同内視鏡センターで下部消化管内視鏡検査を受けた患者から下記の対象を抽出した。

1. 対象

1) 直腸粘膜の検討 (Table 1a)

臨床症状、内視鏡所見、および組織学的所見から診断の確定したUC 79例 (UC群)、小腸・大腸型 (13例) と大腸型 (5例) を合わせたCD 18例 (CD群)、確定診断のついた急性大腸炎13例 (虚血性腸炎8例、感染性腸炎5例) (急性腸炎群)、便秘あるいは便潜血陽性の精査で大腸内視鏡検査を受け異常所見のなかった16例 (健常群) を対象とした。臨床的特徴を

Table 1aに示すが、各疾患群で年齢、性別に関しては差はなかった。UCの罹患範囲は直腸炎型が15例、左半結腸炎型が26例、全結腸炎型が38例であった。このうち、37例は無治療であったが、42例ではプレドニゾロンとサルファ剤のどちらか一方ないし両者の投与を受けていた。

2) 回腸粘膜の検討 (Table 1b)

小腸型 (14例) ないし小腸・大腸型 (22例) CD 36例 (CD群)、感染性腸炎14例 (急性腸炎群)、回腸末端部および大腸に明らかな異常を認めなかった健常群16例を対象とした。CDのうち21例はサルファ剤の投与を受けていたが、15例は無治療であった。

2. 方法

1) 内視鏡検査および組織採取

下部内視鏡検査は全例経口腸管洗浄剤 (ニフレック[®], 森下ルセル, 東京) で前処置後に施行した。内視鏡用生検鉗子を用いて直腸ないし回腸末端より検体を採取した。近接する粘膜より2検体を採取し、一方は2%ホルマリン液で固定後ヘマトキシリン・エオジン染色し組織学的な検討を行った。他方は後述するmRNAの抽出に使用した。なお、mRNA用の検体採取に際しては、生検鉗子を十分に加熱消毒して使用した。

Table 1a. Clinical features of the subjects for the analysis of rectal biopsy

	Noninflammatory Control (n=16)	Inflammatory Control (n=13)		CD (n=18)	UC (n=79)
Age [yrs] (mean)	24-78 (36.6)	26-77 (52.2)	Age [yrs] (mean)	15-65 (32.3)	10-79 (34.6)
Gender (male/female)	(9/7)	(6/7)	Gender (male/female)	(11/7)	(40/39)
Colonic disease			Duration of disease [yrs] (mean)	0-22 5.6	0.2-25 5.1
None	10		Extent of disease		
Diverticula	2		Small intestine	0	
Adenoma	4		Large intestine	5	
Infectious colitis		5	Small and large intestine	13	
Ischemic colitis		8	Total colitis		38
			Left-sided colitis		26
			Proctitis		15
			Therapy*		
			PSL+SASP or 5-ASA	0	11
			SASP or 5-ASA only	10	31
			no therapy	8	37

*PSL; prednisolone, SASP; sulfasalazine, 5-ASA; 5-aminosalicylic acid

Table 1b. Clinical features of the subjects for the analysis of ileal biopsy

	Noninflammatory Control (n=16)	Inflammatory Control (n=14)		CD (n=36)
Age [yrs] (mean)	24-78 (36.9)	26-77 (52.2)	Age [yrs] (mean)	20-65 (32.1)
Gender (male/female)	(6/10)	(8/6)	Gender (male/female)	(30/6)
Colonic disease			Duration of disease [yrs] (mean)	0-19 5.3
None	13		Extent of disease	
Diverticula	2		Small intestine	14
Adenoma	1		Large intestine	0
Infectious colitis		14	Small and large intestine	22
			Therapy*	
			SASP or 5-ASA only	21
			no therapy	15

*SASP; sulfasalazine, 5-ASA; 5-aminosalicylic acid

2) mRNA の抽出および RT-PCR

組織中の RNA は既に報告されている acid guanidium-phenol-chloroform (AGPC 法)⁷⁾を用いて抽出した。すなわち、内視鏡的に得られた生検組織を直ちに AGPC 液 (Isogen®, ニッポンジーン, 富山) に浸し、組織を粉砕・攪拌後 total RNA を抽出した。その後、oligo (dT) cellulose chromatography (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) を用いて mRNA を分離し、吸光度計で 260 nm と 280 nm の吸光度比を測定し、mRNA の純度を確認した。次に、mRNA 溶液 20 μ l に 45 mM Tris 緩衝液 (pH 8.3), 68 mM KCl, 15 mM DTT, 9 mM MgCl₂, RNasin ribonuclease inhibitor 20 単位, および random pd (N) 6 primer 1 μ g (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) を含む反応液 13 μ l を加え moloney murine leukemia virus 由来逆転写酵素 (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) 20 単位を添加し、37°C で 60 分間反応させた。

以上で作成した cDNA を鋳型に、PCR 法でサイトカインの cDNA を増幅した。検討したサイトカインは IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-15 の 6 種類で、加えて internal control として β -actin の PCR も施行した。各 PCR 反応におけるプライマーは既報のもの⁶⁾に準じた。10 mM Tris 緩衝液, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各 200 μ M を含む反応液に cDNA 7 μ l を加え、Taq poly-

merase (宝酒造, 大津) 5 単位を添加し DNA を増幅した。PCR は熱変性 94°C (30 秒), アニリング 60°C (1 分), 伸長反応 72°C (1 分) の条件下で 35 サイクル反応させた。PCR 産物は 2 % アガロースゲル上で電気泳動し、臭化エチジウム染色後、紫外線照射下で発現の有無を判定した。なおすべての症例で β -actin の PCR 反応が陽性であることを確認した。

3) 臨床事項

UC の臨床的活動性は、Seo ら⁸⁾の報告した ulcerative colitis activity index (UCAI) を用いて算出した。CD の活動性は Crohn's disease activity index (CDAI) で評価した⁹⁾。組織採取から 1 週間以内の症状と検査値で算出された UCAI および CDAI の値から、150 以上を活動性、150 未満を非活動性とした。

UC では内視鏡的活動性および組織学的炎症の程度を検討した。内視鏡的活動性は、Blackstone ら¹⁰⁾の提唱する基準で判定した。すなわち、組織を採取した直腸の内視鏡から発赤、びらんあるいは潰瘍を認めれば活動期とし、それ以外は非活動期とした。また、前述した生検組織を光学顕微鏡で観察し、組織学的活動性は Matts らの報告¹¹⁾に従って分類し、grade 2 以下を非活動期、grade 3 以上を活動期と判定した。CD における内視鏡的活動性は明らかな活動性潰瘍を認めれば活動期とし、それ以外は非活動期とした。

本研究の対象となった UC 74 例のうち、64 例で検体採取時から 1 年ないしそれ以上の経過観察が可能であった。これらの患者では、1 年後の活動性も UCAI で評価し、病型を再発（非活動期から活動期へ推移）、改善（活動期から非活動期へ推移）、緩解維持、および慢性持続の 4 型に分類した。

4) 統計学的解析

多群間におけるサイトカイン陽性率はカイ二乗検定で比較した。陽性率が有意に異なるサイトカインに関しては、さらに 2 群間でカイ二乗検定あるいは Fisher の直接確率算出法を用いて陽性率を比較した。また、臨床データの比較には Mann-Whitney 検定と分散分析を用いた。いずれの統計においても、危険率 5% 未満で有意差ありとした。

結 果

1. 直腸粘膜のサイトカイン mRNA 発現

1) 疾患群別サイトカイン mRNA 発現率 (Fig. 1)

UC 群と健常群の比較では、IFN- γ 、IL-2、IL-15 の陽性率には差はなかったが、IL-4 (UC 群 41.8%, 健常群 6.3%, $p = 0.005$), IL-10 (UC 群 72.2%, 健常群 37.5%, $p = 0.01$), および IL-13 (UC 群 43.0%, 健常群 6.3%, $p = 0.008$) の陽性率は UC で有意に高かった。UC 群と急性腸炎群の比較では、IL-4 (UC 群 41.8%, 急性腸炎群 7.7%, $p = 0.03$) の陽性率が UC 群で有意に高かったが、IL-10 と IL-13 の陽性率に差はなかった。

CD 群と健常群ないし急性腸炎群の比較では、いずれのサイトカインの陽性率にも差は認められなかった。しかし、CD 群と UC 群を比較すると、IL-13 (CD 群 16.7%, UC 群 43.0%, $p = 0.03$) の陽性率が UC 群で有意に高値を示した。

2) UC の活動性とサイトカイン

mRNA 発現率の関係

UC の罹患範囲、ステロイドやサルファ剤投与の有無、罹患期間と各サイトカイン発現率に有意な関係は認めなかった。

Table 2 に、組織採取時の UC の活動性を示す。UCAI では 34 例、内視鏡所見では 45 例、組織学的には 44 例が活動期に分類された。各評価方法で分類した活動期と非活動期 UC におけるサイトカイン陽性率の比較を Table 3 に示す。UCAI による分類では、IFN- γ 、IL-2、IL-10 の陽性率に差はみられなかったが、IL-4 (活動期 70.6%, 非活動期 20.0%, $p < 0.001$) および IL-13 (活動期 64.7%, 非活動期 26.7%, $p < 0.001$) の陽性率が有意に活動期 UC で高値を示した。同様に、内視鏡的活動性および組織学的活動性による分類でも活動期 UC の IL-4 お

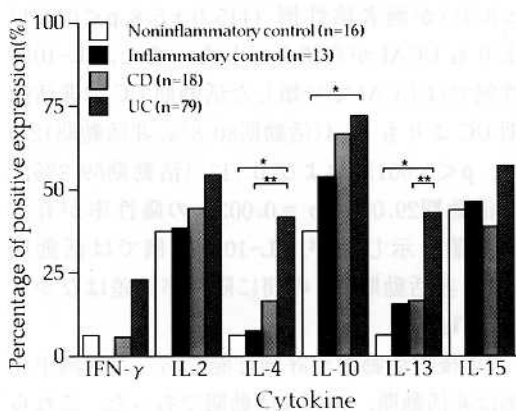


Fig. 1. Comparison of the incidence of positive RT-PCR in the rectal biopsy specimens among noninflammatory control, inflammatory control, CD and UC. Bars with asterisk indicate significant difference between two groups (* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$).

Table 2. Number of patients with active or inactive disease according to clinical activity and endoscopy

Classification	Clinical activity	Endoscopy	Histology
Inactive UC	45 (UCAI < 150)	34 (quiescent)	35 (Grade < 3)
Active UC	34 (UCAI \geq 150)	45 (mild active or more)	44 (Grade \geq 3)
Total	79	79	79
Inactive CD	25 (CDAI < 150)	20 (quiescent)	
Active CD	11 (CDAI \geq 150)	16 (mild active or more)	
Total	36	36	

Table 3. Comparison of positive expression rate between active and inactive UC determined by clinical activity, endoscopy or histology

Cytokines	Clinical activity		Endoscopy		Histology	
	Inactive (n=45)	Active (n=34)	Inactive (n=34)	Active (n=45)	Inactive (n=35)	Active (n=44)
IFN- γ	11 (24.4%)	7 (20.6%)	7 (20.6%)	11 (24.4%)	9 (25.7%)	9 (20.5%)
IL-2	22 (48.9%)	20 (61.8%)	17 (50.0%)	25 (55.6%)	21 (60.0%)	21 (47.7%)
IL-4	9 (20.0%)*	24 (70.6%)*	4 (11.8%)*	29 (64.4%)*	7 (20.0%)*	26 (59.1%)*
IL-10	31 (68.9%)	26 (76.5%)	25 (73.3%)	32 (71.1%)	23 (65.7%)	34 (77.3%)
IL-13	12 (26.7%)*	22 (64.7%)*	7 (20.6%)*	27 (60.0%)*	9 (25.7%)*	25 (56.8%)*
IL-15	24 (53.3%)	21 (61.8%)	17 (50.0%)	28 (62.2%)	20 (57.1%)	25 (56.8%)

*; significantly different between inactive and active UC ($p < 0.01$)

および IL-13 の陽性率が非活動期 UC よりも有意に高値を示した。

以上の結果から、UC を IL-4 および IL-13 陽陰性で 4 群に分けて UCAI を比較検討した。Figure 2 に示すように 4 群間での UCAI は有意に異なり、IL-4 陽性かつ IL-13 陽性例 (160.6 ± 8.3) が両者陰性例 (115.0 ± 5.8 , $p < 0.001$) よりも UCAI が高値を示した。また、IL-10 陽性例では UCAI で分類した活動期 UC で非活動期 UC よりも IL-4 (活動期 80.8%, 非活動期 12.9%, $p < 0.001$) および IL-13 (活動期 69.2%, 非活動期 29.0%, $p = 0.003$) の陽性率が有意に高値を示したが、IL-10 陰性例では活動期 UC と非活動期 UC の間に陽性率は差はなかった (Fig. 3)。

1年後の活動性が評価可能であった 64 例中 48 例は非活動期、16 例は活動期であった。これら 2 群における初回検査時のサイトカイン発現率には差を認めなかった (Table 4)。また、1 年間の臨床経過分類でも、改善 (21 例)、再発 (8 例)、緩解維持 (27 例)、慢性持続 (8 例) の 4 型で初回の発現率が有意に異なるサイトカインは指摘できなかった。

2. 回腸粘膜のサイトカイン mRNA 発現

1) 疾患群別サイトカイン mRNA 発現率 (Fig. 4)

CD 群および急性腸炎群で、IL-10 の発現率が健常群よりも有意に高かった (CD 群 75.0%, 急性腸炎群 85.7%, 健常群 30.8%, $p = 0.005$)。しかしながら、CD 群と急性腸炎群の間には IL

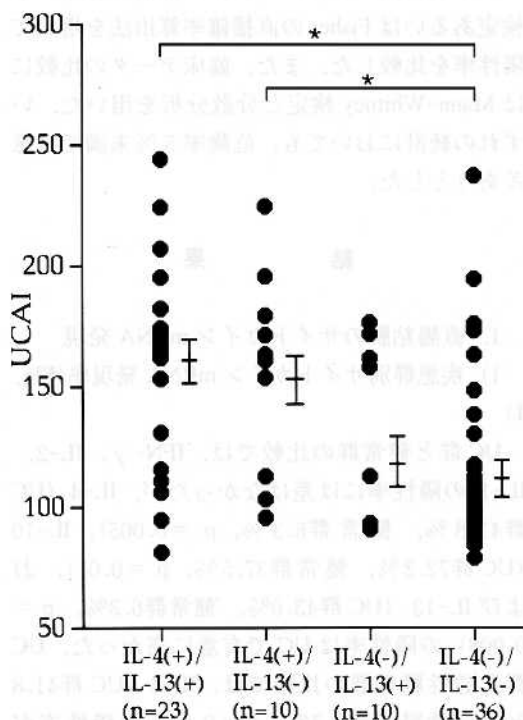


Fig. 2. Comparison of UCAI among four UC groups classified by the result of IL-4 and IL-13 expression. The UCAI was significantly different among the groups (* $p < 0.01$).

-10 を含めてサイトカイン発現率に差はなかった。

2) CD の活動性とサイトカイン mRNA 発現率の関係 (Table 5)

CD 32 例は CDAI から活動期 11 例、非活動期 25 例に分類された (Table 2)。Table 5 に示すように、活動期と非活動期 CD の 2 群間でいずれのサイトカインの陽性率にも差は認められなかった。また、回腸末端部における内視鏡活動

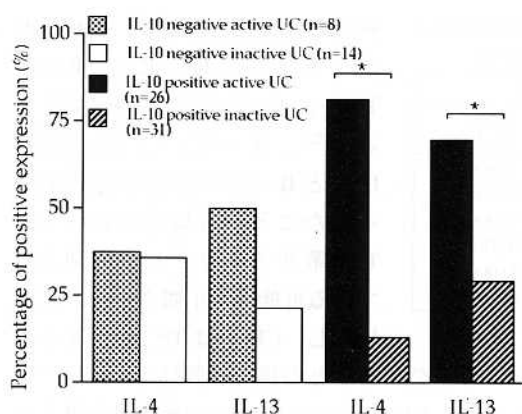


Fig. 3. Correlation between clinical activity and expression of IL-4 or IL-13 in the biopsy specimens in two groups of UC classified by the result of IL-10. In IL-10 positive subjects, positive rates of both IL-4 and IL-13 are higher in active UC than in inactive UC. Such differences are not found in IL-10 negative subjects. Bars with asterisk indicate significant difference between two groups (* $p < 0.01$).

性病変の有無でもサイトカイン陽性率に有意差は指摘できなかった。

考 察

IBD 患者のサイトカインに関してはこれまで種々の検討が報告され、病態との関係が解明されつつある。しかし、サイトカイン相互作用が複雑であるに加えて、検討対象や検体、測定手技、臨床像の評価方法などが異なるため、必ずしも一定の結果が得られていないのが現状である。本研究では、IBD における局所サイトカインの発現と臨床像との関係を明らかにする

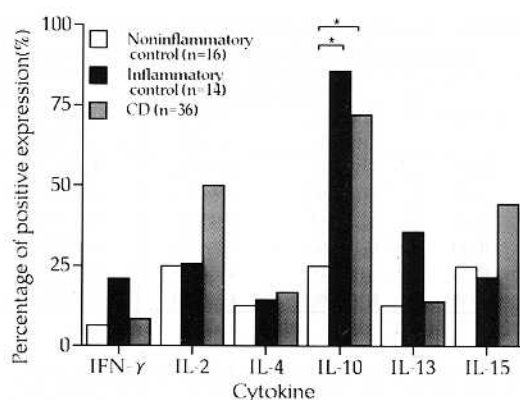


Fig. 4. Comparison of the incidence of positive RT-PCR in the ileal biopsy specimens among noninflammatory control, inflammatory control and CD. Bars with asterisk indicate statistically significant difference between two groups (* $p < 0.01$).

ことを目的として、腸管局所の mRNA を検討した。その結果、活動期 UC 患者で IL-4 および IL-13 の mRNA 発現率が高いことが明らかとなり、これらのサイトカインが UC の病態に関与する可能性が示唆された。今回用いた RT-PCR 法による消化管局所の mRNA 発現を検討した研究は未だ少ない。しかし、本法は微量の mRNA の検出に優れるため、少量の消化管生検組織でも mRNA 発現の有無が検討可能である。従って、本法は消化管疾患の病態解明や病因究明のみならず、活動性の評価や診断などの点において臨床応用も可能と考えられる。

近年、T 細胞の機能を部分的に欠損する様に作製されたいくつかの遺伝子ノックアウトマウスが IBD 類似の腸炎を自然発症することから、

IBD の原因が T 細胞の機能異常に起因する可能性が指摘されている。なかでも、IL-2 ノックアウトマウスでは粘膜に T 細胞を中心とした著明な細胞浸潤と IgA および IgG 1 産生細胞の増加、および腸上皮での MHC class II 抗原の発現が認められる¹²⁾。一方、T 細胞レセプター α 鎖 (TCR- α) ノックアウトマウスでも IL-2 の著明な減少を伴った IBD 類似の

Table 4. Comparison of positive expression rate between active and inactive UC determined by follow-up data

Cytokines	1 year later Inactive UC (n=48)	1 year later Active UC (n=16)
IFN- γ	12 (25.0%)	5 (31.3%)
IL-2	27 (56.3%)	8 (50.0%)
IL-4	20 (41.7%)	6 (37.5%)
IL-10	38 (79.2%)	10 (62.5%)
IL-13	21 (43.8%)	6 (37.5%)
IL-15	31 (64.6%)	11 (68.8%)

The activity of UC was determined by clinical activity

Table 5. Ileal biopsy subjects. Comparison of positive expression rate between active and inactive CD determined by clinical activity or endoscopy

Cytokines	Clinical activity		Endoscopy	
	Inactive (n=25)	Active (n=11)	Inactive (n=20)	Active (n=16)
IFN- γ	2 (8.0%)	1 (9.1%)	0 (0.0%)	3 (18.8%)
IL-2	14 (56.0%)	4 (36.4%)	10 (50.0%)	8 (50.0%)
IL-4	5 (20.0%)	1 (9.1%)	3 (15.0%)	3 (18.8%)
IL-10	18 (72.0%)	8 (72.7%)	14 (70.0%)	12 (75.0%)
IL-13	2 (8.0%)	3 (27.3%)	2 (10.0%)	3 (18.8%)
IL-15	12 (48.0%)	4 (36.4%)	10 (50.0%)	6 (37.5%)

腸炎が発症する¹³⁾。以上の実験モデルに加えて、IBD患者では腸管粘膜内IL-2産生細胞が減少するとの報告¹⁴⁾があり、IL-2がIBDの発症に関与している可能性が示唆されている。しかし、UCの局所粘膜におけるIL-2mRNAの発現はCDに比べ低いとの報告もあり^{15), 16)}、一致した見解が得られていない。本研究では、CDないしUC群と対照群でIL-2の陽性率に差を指摘出来なかった。従って、mRNAの発現からみた場合、IL-2の産生と疾患特異性に関してはさらなる検討が必要と思われた。

一方、非リンパ球系細胞である単球/マクロファージや上皮細胞、平滑筋細胞で産生されるIL-15^{17), 18)}は、IL-2と様々な生物学的活性を共有するが、IBDにおける役割は未だ十分には解明されていない。これまでの報告では、活動期UC患者における血清IL-15上昇や、UCや活動期CDの腸管粘膜におけるIL-15の産生ないしmRNA発現の増強が報告されている^{19), 20)}。しかし、本研究ではいずれの疾患群においてもIL-15の発現率に差が見られなかったことから、IBDの病態との関連性を推測しえなかった。

一般的に、UCでは、Th1系よりもTh2系サイトカインが病態に密接に関与していると考えられている⁵⁾。本研究でも、UCではTh2系サイトカインのmRNAが局所でより高率に発現していた。Th2系サイトカインのうち、IL-4は炎症抑制物質としてリンパ球やマクロファージに作用して免疫調整を行い、特にIFNの産生抑制、ならびにIL-10やその他の抗炎症性サイトカインの産生を促進することが知られている^{21)~23)}。IL-10もマクロファージやTh1

細胞の活性化を抑制し、炎症性サイトカインであるIL-1、IL-6、TNF- α などの産生を抑制する^{24), 25)}。従って、UCにおけるIL-4とIL-10の陽性率が高値を示したことから局所においてはTh1系サイトカインが抑制されている可能性が示唆された。これに対し、CDではTh1系サイトカ

インが優位であるとの報告が散見される^{15), 16)}。しかし、CDにおいてIFN- γ の産生は亢進していないとする報告もあり²⁶⁾、結果は一致していない。本研究ではTh1系サイトカインの陽性率は直腸と回腸とともにCD群と対照群で差はなかったことから、CDの局所におけるmRNAの発現は亢進していないと考えるのが妥当と思われる。

局所粘膜におけるmRNAの発現を検討した報告によると、IL-10は健常者や非活動性のIBDに比べ活動期IBDにおける増加が認められている^{16), 27)}。本研究でもIL-10の発現率は健常群に比べUCとCDの両群で増加していた。しかし、直腸および回腸末端の両部位において急性腸炎群とはその陽性率に差はなかった。従って、IL-10の発現はUCないしCDに特異的ではなく、むしろ腸管の非特異的炎症に関与すると推測された。IL-10ノックアウトマウス²⁸⁾で発症する腸病変がIL-10の投与で改善することを考え合わせるとIL-10の発現は炎症に対し抑制的に作用すると考えられる。

UCではIL-4の発現が増加することが明らかにされているが^{5), 29)}、本研究でもUCで有意なIL-4の発現率の増加がみられ、かつ活動期UCでその発現率が高値を示した。TCR- α ノックアウトマウス腸炎において、IL-4遺伝子の発現を抑制すると腸炎の発生が抑制される³⁰⁾ことから、UCにおけるIL-4の発現は炎症に促進的に作用していると思われる。IL-13はその分子構造のみならずサイトカイン産生を抑制するという点でもIL-4に類似した活性を有している³¹⁾。しかし、IBDにおける役割に関して

は十分に検討されておらず、腸管局所での mRNA 発現は一つの報告をみるに過ぎない。その結果では、活動期 UC において CD や健常者よりも発現の増加が指摘されている²⁷⁾。本研究においても、UC で IL-13 の発現率は高値で、かつ活動期 UC で顕著な発現率の増加を認めた。従って、IL-4 と同様に IL-13 も UC の病因や活動性に関与している可能性が示唆された。

生体内では、個々のサイトカインが単独で作用するだけではなく複数のサイトカインがネットワークを形成し相乗的に疾患の活動性や病因に関与すると考えられている^{32), 33)}。本研究においても UC では IL-4 と IL-13 の結果で分類した 4 群間で臨床的活動性が有意に異なり、さらにこれらのサイトカイン発現率に IL-10 の相互作用が示唆された。

今回検討したサイトカインで CD 群に特異的、あるいは CD の活動性に関与するものはなかったが、UC では直腸粘膜局所の IL-4 および IL-13 の発現率と活動性との間に明らかな関係が認められた。しかし、UC の臨床経過とサイトカイン発現に有意な関係を指摘しえなかったことから、局所サイトカインの発現パターンから臨床経過を予測し、治療計画をたてることは困難と思われた。ただし、本研究では経過観察中の治療を必ずしも統一しえなかったもので、長期経過と局所サイトカインの発現の関係についてはさらに検討する必要がある。

以上のように、UC および CD の局所粘膜におけるサイトカイン遺伝子の発現を臨床的活動性との関係を中心に検討したが、蛋白発現細胞の同定とともに、サイトカインの相互作用の解明が今後必要と思われる。

結 語

IBD 患者における IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10、IL-13、IL-15 の mRNA の発現を RT-PCR 法で検討し、以下の結果を得た。

- (1) UC では IL-4 と IL-13 の陽性率が急性腸炎や CD よりも有意に高かった。
- (2) 活動期 UC では非活動期 UC よりも IL-4 と IL-13 の陽性率が高かった。
- (3) UC および CD の両者で健常者よりも IL-10 の発現率が高かったが、急性腸炎とは差はなかった。
- (4) UC では IL-4 陽性かつ IL-13 陽性例が両者陰性例よりも UCAI が高値を示した。また、IL-10 陽性例では活動期 UC で非活動期 UC よりも IL-4 および IL-13 の陽性率が有意に高値を示した。
- (5) IL-2、IFN- γ 、および IL-15 の発現率には疾患特異性や活動性との関連は指摘出来なかった。

以上より、UC においては Th 2 系サイトカインの中でも IL-4 と IL-13 が局所の炎症に重要な役割を担っていると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました川崎医科大学消化器内科Ⅱ教室 飯田三雄教授に深甚なる謝意を表します。また御校閣頂きました九州大学光学医療診療部 松本主之先生および本研究に御協力頂いた北海道大学人体病理学 清水道生先生ならびに川崎医科大学消化器内科Ⅱ教室の諸兄に深く感謝します。なお、本研究の一部は、大学院重点特別経費（平成9年度、平成10年度）の援助によって行われたことを付記し深謝します。

文 献

- 1) Podolovsky DK: Inflammatory bowel disease. N Eng J Med 325: 928-937, 1991
- 2) Isaacs KL, Sartor RB, Haskill S: Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by

- polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology* 103 : 1587-1595, 1992
- 3) Brynkvog J, Nielsen OH, Ahnfelt-Røfne I, Bendtsen K : Cytokines in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 27 : 897-906, 1992
 - 4) Sartor RB : Cytokines in intestinal inflammation : Pathophysiologic and clinical considerations. *Gastroenterology* 106 : 533-539, 1994
 - 5) Mosmann TR, Coffman RL : Th1 and Th2 cells : different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7 : 145-173, 1989
 - 6) Inoue S, Matsumoto T, Iida M, Mizuno M, Kuroki F, Hoshika K, Shimizu M : Characterization of cytokine expression in the rectal mucosa of ulcerative colitis : correlation with disease activity. *Am J Gastroenterol* 94 : 2441-2446, 1999
 - 7) Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 : 156-159, 1987
 - 8) Seo M, Okada M, Yao T, Ueki M, Arima S, Okumura M : An index of disease activity in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 87 : 971-976, 1992
 - 9) Best WR, Becktel JM, Singleton JW, Kern-F Jr : Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 70 : 439-444, 1976
 - 10) Blackstone M : Endoscopic interpretation : Normal and pathologic appearances of the gastrointestinal tract. New York, Raven Press, 1984
 - 11) Matts SGF : The value of rectal biopsy in the diagnosis of ulcerative colitis. *Q J Med* 120 : 393-410, 1961
 - 12) Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I : Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75 : 253-261, 1993
 - 13) Mizoguchi A, Mizoguchi E, Chiba C, Spiekermann GM, Tonegawa S, Nagler AC, Bhan AK : Cytokine imbalance and autoantibody production in T cell receptor- α mutant mice with inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 183 : 847-856, 1996
 - 14) Kusugami K, Matsuura T, West GA, Youngman KR, Rachmilewitz D, Fiocchi C : Loss of interleukin-2-producing intestinal CD4⁺ T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 101 : 1594-1605, 1991
 - 15) Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker SJA, MacDonald TT : Interleukin-2- and interferon- γ -secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 78 : 127-131, 1993
 - 16) Niessner M, Volk BA : Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol* 101 : 428-435, 1995
 - 17) Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdieh M : Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264 : 965-968, 1994
 - 18) Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, Anderson D, Eisenmann J, Grabstein K, Caligiuri MA : Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 180 : 1395-1403, 1994
 - 19) Kirman I, Nielsen OH : Increased numbers of interleukin-15-expressing cells in active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 91 : 1789-1794, 1996
 - 20) Sakai T, Kusugami K, Nishimura H, Ando T, Yamaguchi T, Ohsuga M, Ina K, Enomoto A, Kimura Y, Yoshikai Y : Interleukin 15 activity in the rectal mucosa of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 114 : 1237-1243, 1998
 - 21) TeVelde AA, Huijbens RJF, Heije K, DeVries JE, Figdor CG : Interleukin-4 inhibits secretion of IL-1 β tumor necrosis factor α , and IL-6 by human monocytes. *Blood* 76 : 1392-1397, 1990
 - 22) Standiford TJ, Strieter RM, Chensue SW, Westwick J, Kasahara K, Kunkel SL : IL-4 inhibits the expression of IL-8 from stimulated human monocyte. *J Immunol* 145 : 1435-1439, 1990
 - 23) Paul WE : Interleukin-4 : A prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77 : 1859-1870, 1991

- 24) Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A : IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophage. *J Immunol* 147 : 3815-3822, 1991
- 25) Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A : IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146 : 3444-3451, 1991
- 26) Nakamura M, Saito H, Kasanuki J, Tamura Y, Yoshida S : Cytokine production in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 33 : 933-937, 1992
- 27) Radford-Smith G, McGowan I, Jewell DP : Th1 and Th2 cytokine gene expression in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 106 : A757, 1994
- 28) Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W : Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75 : 263-274, 1993
- 29) Nielsen OH, Koppen T, Rudiger N, Horn T, Eriksen J, Kirman I : Involvement of interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 41 : 1786-1793, 1996
- 30) Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK : The critical role of interleukin 4 but not interferon gamma in the pathogenesis of colitis in T-cell receptor alpha mutant mice. *Gastroenterology* 116 : 320-326, 1999
- 31) McKenzie AN, Culpepper JA, DeWaal MR, Briere F, Punnonen J, Aversa G, Sato A, Dang W, Cocks BG, Menon S : Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc Natl Acad Sci* 90 : 3735-3739, 1993
- 32) Kucharzik T, Lügering N, Adolf M, Domschke W, Stoll R : Synergistic effect of immunoregulatory cytokines on peripheral blood monocytes from patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 42 : 805-812, 1997
- 33) Lügering N, Kucharzik T, Stein H, Winde G, Lügering A, Hasilik A, Domschke W, Stoll R : IL-10 synergizes with IL-4 and IL-13 in inhibiting lysosomal enzyme secretion by human monocytes and lamina propria mononuclear cells from patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 43 : 706-714, 1998